



Prêtre: pinx. d'après d'Orbigny.

Levrault: Editeur.

Victor: sculp.

1-5 AMPULLARIA scalaris, d'Orb. 4. A.....canaliculata, Lam. var. B.

5.6. A.....canaliculata, var.

Litografía de ampularias publicada en
Voyage dans l'Amérique méridionale (1835), de
 Alcide D'Orbigny. Gentileza Biblioteca MACN

Impr^{ie} de Langlois.

Horacio Heras

Instituto de Investigaciones Bioquímicas
de La Plata, UNLP-Conicet

¿Por qué hay huevos que nadie quiere comer?

La ampularia o caracol manzana

Los huevos de los animales, con sus nutritivas reservas de las que se alimenta el embrión, son comida preferida de muchos predadores. Pero hay excepciones: una que consideraremos en esta nota está constituida por los huevos del caracol de agua dulce comúnmente llamado *ampularia* o *caracol manzana* (*Pomacea canaliculata*). Seguramente la mayoría de los lectores de CIENCIA HOY lo conocen, ya que es un molusco abundantemente representado en lagunas, bañados, esteros, arroyos, canales y hasta zanjales con nutrida vegetación de la mayor parte de la cuenca del Plata.

Integra una especie nativa de Sudamérica que se ha convertido en plaga para la agricultura de varios países del sudeste asiático. La caparazón pardo-amarillento de sus adultos alcanza unos cinco centímetros de diámetro y estos viven unos dos años: rara vez superan los dos inviernos, a diferencia de los de otra especie muy semejante del mismo género (*P. maculata*), que habitan la misma cuenca y la amazónica, y pueden vivir cuatro años.

Las ampularias depositan sus huevos fuera del agua, en llamativas masas de brillante color rosado que se suelen advertir en rocas, juncos, ramas o postes, y que la sabiduría popular identifica equivocadamente como huevos de sapos o ranas. Una sola hembra de caracol puede depositar entre mil y diez mil huevos en su vida, a los cuales, a pesar de contener gran cantidad de azúcares y proteínas —llamadas *perivitelinas*—, solo se les conoce un predador confirmado: la hormiga de fuego o colorada (*Solenopsis geminata*). Esto se debe a que algunas de dichas proteínas serían tóxicas para otros potenciales predadores, como la que confiere a los huevos el mencionado color rosa intenso, el cual salta a la vista en el medio y sería interpretado por los potenciales predadores como señal de advertencia.

Las ampularias son muy resistentes a condiciones ambientales adversas debido a una combinación de características bioquímicas, anatómicas, fisiológicas y de comportamiento. Sobreviven por semanas y hasta meses a desecación, baja concentración de oxígeno en el agua y privación de alimentos. Además de la branquia que

¿DE QUÉ SE TRATA?

Los huevos de la ampularia, un caracol ampliamente conocido en la cuenca del Plata, tienen un sistema químico de defensa único entre los animales, que resulta eficaz ante todos los predadores, salvo ante una especie de hormiga.

les permite tomar oxígeno del agua, poseen una especie de pulmón al que llega aire aspirado por un largo tubo llamado sifón, semejante a un snorkel de buceo. La combinación de cuasipulmón y branquia es una adaptación evolutiva a hábitats con aguas pobres en oxígeno.

Llegan a la madurez sexual en un lapso de entre dos y cuatro meses y, a diferencia de los caracoles de jardín que son hermafroditas, tienen los sexos separados. Se reproducen en el agua, luego de una copulación que dura hasta veinte horas. La hembra puede almacenar el esperma durante toda la estación reproductiva, que en la Argentina abarca desde la primavera hasta comienzos del otoño, para ir fecundando los huevos en tandas. Rodea cada óvulo fertilizado con una sustancia viscosa nutritiva y protectora, llamada *fluido perivitelino*, y con una cáscara calcárea. Esas envolturas son producidas y secretadas por una glándula compleja llamada glándula del albumen.

La práctica de adherir los huevos (en masas de unos trescientos) a soportes fuera del agua no solo está acompañada por adaptaciones anatómicas y fisiológicas de los adultos; también las incluye en la bioquímica de los huevos, que les permiten soportar insolación, desecación y repeler depredadores terrestres.

lista y explorador francés Alcide d'Orbigny (1802-1857), que recorrió Sudamérica entre 1826 y 1833 y relató que solo los caracoles recién nacidos y los adultos son presas de aves acuáticas. A diferencia de los huevos, los adultos son parte de varias cadenas alimentarias y tienen gran variedad de predadores americanos, como caimanes (*Caiman latirostris*), ranas leopardo (*Rana pipiens*), bagres (*Bunocephalus* sp.), cuervillos de cañada (*Plegadis chihi*), caraus (*Aramus guarauna*) y ratas (*Oryzomys* sp.).



¿Quién come ampularias?

El primero en observar la falta de predadores de los huevos de ampularia posiblemente haya sido el natura-

Ampularia o caracol manzana (*Pomacea canaliculata*). Como todos los caracoles, se apoya sobre el pie que se advierte en la parte inferior. Este caracol particular es anfibio y puede respirar aire gracias a un sifón (que sobresale hacia la derecha) y una ampolla que oficia de pulmón. Hacia la izquierda se extienden los tentáculos cefálico y labial.



Concha de un ejemplar de acuario de ampularia o caracol manzana (*Pomacea canaliculata*). Su diámetro es de unos 5cm. Foto H Zell, Wikimedia Commons.

Sin embargo, el principal predador de estos moluscos probablemente sea un ave rapaz, el gavián caracolero (*Rostrhamus sociabilis*), que se alimenta casi exclusivamente de ellos. Tiene un pico adaptado a retirar los caracoles de sus conchas, de las que es común ver montículos al pie de los postes de alambrados en que se posa. También es frecuente encontrar en el suelo, junto a las conchas, restos de la glándula del albumen de los caracoles hembras, la que secreta el fluido previtelino tóxico, la cual también tiene el mencionado color rosado. El caracolero invariablemente la descarta.

Las proteínas de los huevos del caracol manzana

Los huevos de ampularia contienen uno de los sistemas de defensa bioquímica contra predadores más eficiente que se conoce entre los animales. Su llamativa coloración forma parte de ese sistema, y advertiría a los potenciales depredadores sobre la presencia de alguna sustancia tóxica o desagradable, que sería su principal línea de resguardo, y está dada por las proteínas del fluido perivitelino que rodea al embrión, la mayoría de las cuales —entre ellas las denominadas ovorrubina y PcPV2— se sintetizan en la mencionada glándula del sistema reproductor femenino. Esas dos proteínas representan casi el 70% de todas las que tiene el huevo y es la ovorrubina la



Caracolero (*Rostrhamus sociabilis*). En la cuenca del Plata este rapaz es el principal predador de caracoles manzana, de los que evita comer los huevos y la glándula que produce la toxina encontrada en ellos. Adviértase a sus pies la concha del caracol y la forma de su pico, evolutivamente adaptada para sacar de ella el cuerpo del molusco. Foto Cleber Ferreira, Flickr.

que dota a los huevos del color rosado. Nuestros experimentos indicarían que las toxinas del huevo ya están activas en la glándula, lo que proporciona una explicación bioquímica de por qué el caracolero no la come.

Las proteínas son fundamentales en todos los procesos biológicos. Por ello, es importante comprender cómo actúan, para lo cual necesitamos conocer su estructura interna, ya que su función depende de esta. Si bien el fluido perivitelino del caracol manzana contiene unas 59 proteínas, en nuestros estudios solo analizamos en detalle

LA AMPULARIA COMO ESPECIE INVASORA

A principios de la década de 1980, alguien llevó de la Argentina ejemplares de ampularia al sudeste asiático, para alimentación humana y para poblar acuarios (véase MC Damborenea y G Darrigran, 'Un sudamericano invade Asia', CIENCIA HOY, 11, 66: 24-30, diciembre de 2001-enero de 2002). Allí, en un clima tropical que les resultó propicio, con abundante alimento en arrozales y humedales, y sin enemigos naturales, se reprodujeron y aumentaron en número y área geográfica de dispersión, en la que se volvieron una especie invasora. Hoy se encuentran en la India, Ceilán, el sur de China, la antigua Indochina, Indonesia, las Filipinas, Taiwán y hasta Japón. En Sudamérica cruzaron los Andes y alcanzaron Perú y Ecuador, y también llegaron hasta los Estados Unidos, en la periferia del golfo de México. Su pariente cercano *P. maculata* fue detectado por primera vez en Europa en 2008, en el Ebro, en España, y también la especie se hizo invasora: en 2010 se estimó que su población alcanzaba unos seis millones de individuos.

En estas invasiones los caracoles manzana se han convertido en plaga de cultivos de arroz y otros, y provocado considerables perjuicios y pérdidas económicas. Aún no se halló un modo de controlarlos, si bien se está investigando intensamente para procurar encontrarles su talón de Aquiles. En adición, estos moluscos albergan a varios parásitos, como en Asia el gusano nematodo *Angiostrongylus cantonensis*, que causa una meningoencefalitis humana. La cantidad de casos está aumentando por el avance de este invasor, sobre todo en China, y se han detectado recientemente focos de infección por *Angiostrongylus costarricensis* en Centroamérica y el Brasil.

Desde el punto de vista humano, no todo lo relacionado con las ampularias es negativo: podrían emplearse como agente de control biológico de caracoles transmisores de esquistosomiasis, otra enfermedad parasitaria de Sudamérica, muchas veces letal. También, aprovechando su apetito se los ha sugerido para el control de malezas acuáticas de canales de riego en el sur de la provincia de Buenos Aires.

Su avance en Asia ha valido a los caracoles manzana la inclusión en la lista de las cien especies exóticas invasoras más dañinas del mundo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

las dos indicadas, que forman partículas tan grandes que se pueden ver con microscopio electrónico. La composición química de ambas incluye gran cantidad de azúcares, los que les confieren propiedades como solubilidad en agua y, posiblemente, resistencia a ser digeridas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las dos unidades que forman la proteína PcPV2 reveló que una tiene ciertas semejanzas con lectinas capaces de reconocer azúcares de membranas celulares, y la otra se asemeja a una familia de proteínas formadoras de poros en las

membranas celulares, llamada MACPF. Ambas proteínas participan en la respuesta inmune en otros animales, pero en el caso que nos ocupa, combinadas, tienen función neurotóxica. Además, su estructura no se parece a la de otras toxinas animales, pero es muy similar a algunas toxinas de plantas, como la de la semilla del ricino y la toxina botulínica de la bacteria *Clostridium botulinum* (la popular botox). La similitud estructural de estas toxinas y la capacidad de la lectina de unirse a cierto tipo de membranas sugiere que la lectina de la PcPV2 dirigiría la mencionada

unidad MACPF, que actuaría en la perforación de membranas, si bien esto requiere aún de comprobación mediante más experimentos. Este descubrimiento permite imaginar, sin embargo, que estas toxinas tengan aplicaciones farmacológicas en cuanto a dirigir la toxina a tejidos específicos, como células cancerosas, aunque esto, por el momento, es solo especulación.

Tanto la ovorrubina como la PcPV2 son resistentes a la acción combinada de dos enzimas del sistema digestivo de muchos animales, la pepsina y la tripsina. Utilizando una técnica llamada



Huevos de ampularia depositados sobre una roca. Cada grupo de huevos mide unos 5cm de largo.



Huevos de ampularia depositados sobre juncos de una laguna de la provincia de Buenos Aires.

dispersión de rayos X de bajo ángulo pudimos construir modelos en tres dimensiones de estas proteínas. El estudio mostró que ambas tienen una estructura globular, y que, pese a ser muy grandes y complejas, son estables en medios muy ácidos o muy alcalinos, semejantes a los que existen en el sistema digestivo de los animales.

Funciones de las proteínas de los huevos

Las proteínas de los huevos tienen múltiples funciones. Las del caracol manzana, entre otras cosas, nutren el embrión en desarrollo, al que proveen energía y aminoácidos. La ovorrubina le aporta el pigmento astaxantina, un antioxidante quinientas veces más potente que la vitamina E, que protegería las membranas de sus células de estrés oxidativo. También lo defienden de la

depredación, en primer lugar, por la coloración dada por la ovorrubina, cuya acción es disuasoria. Los patrones brillantes y contrastantes de los huevos son fáciles de aprender a reconocer. Comunicarían la advertencia de que algo desagradable podría ocurrir a quienes los comieran. Es un mensaje que, evidentemente, llega a los predadores, pues, salvo una hormiga nadie los come. Lo mismo se advierte en muchas especies fuertemente coloreadas que suelen ser ponzoñosas, como, para tomar ejemplos de la cuenca del Plata, la serpiente de coral (*Micrurus corallinus*) y las mariposas monarca (*Danaus spp.*) y almendra (*Heliconius spp.*).

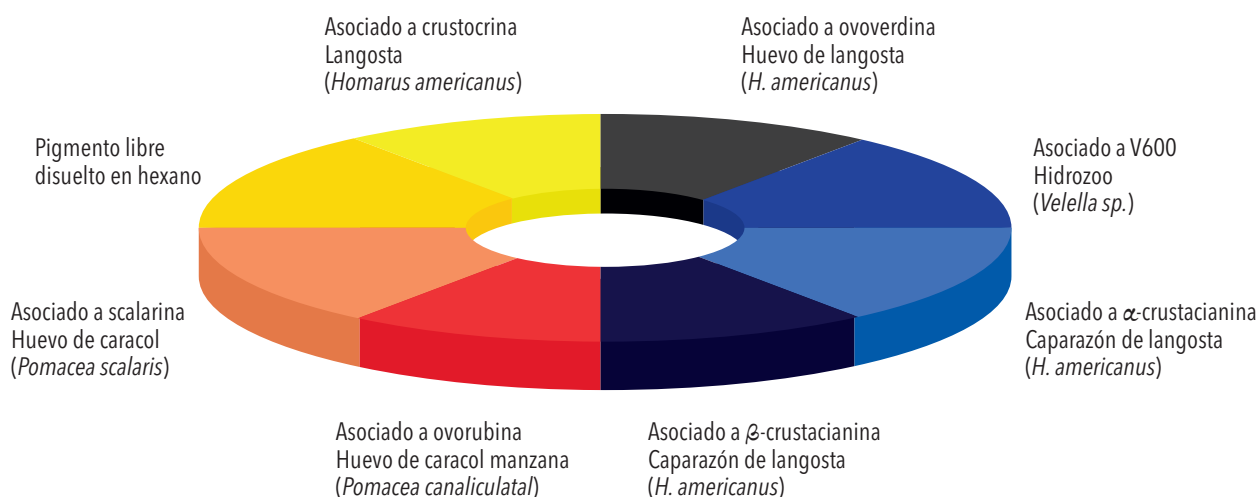
Si a pesar de la advertencia dada por el color un predador consume los huevos, entran en acción otras armas bioquímicas. Así, se ha comprobado que la PcPV2 es una potente neurotoxina que daña la médula espinal de los ratones y los mata en unas treinta horas, pues les altera el metabolismo del calcio e induce la muerte celular de grupos específicos de neuronas de la sustancia

EL COLOR DE LOS HUEVOS

Lo primero que llama la atención al advertir en el medio natural la presencia de huevos de ampullaria es su color rosado. Muchos invertebrados acuáticos exhiben sus cuerpos coloreados por efecto de ciertas proteínas pigmentadas con *carotenos*. Les sirven como camuflaje para escapar de predadores, como coloración de advertencia y para los rituales de apareamiento. El pigmento carotenoides *astaxantina* es el más frecuente; cubre la gama completa de colores en el rango de la luz visible. La capacidad de un solo pigmento de lograr esto se debe a que su interacción con diferentes proteínas altera su espectro de absorción de la luz, como lo muestra la figura. Así, la unión de astaxantina con *ovorrubina* produce el color rojo,

mientras que con *crustacianina* colorea de azul al caparazón de cangrejos, langostinos, camarones y langostas.

Los cambios de color también dependen de la estabilidad de las carotenoproteínas. El caparazón de langostinos, que es azulado en los animales vivos, se torna rojizo al cocinarlos porque la crustacianina pierde su estructura con el calor y libera el pigmento, lo que provoca el cambio a la coloración roja que vemos sobre el plato. En esto, nuevamente, los huevos del caracol manzana dan la nota, ya que hervirlos no les cambia el color. Esto se debe a que la ovorrubina no pierde su estructura por las altas temperaturas. Incluso soporta casi sin alteraciones los 100°C.

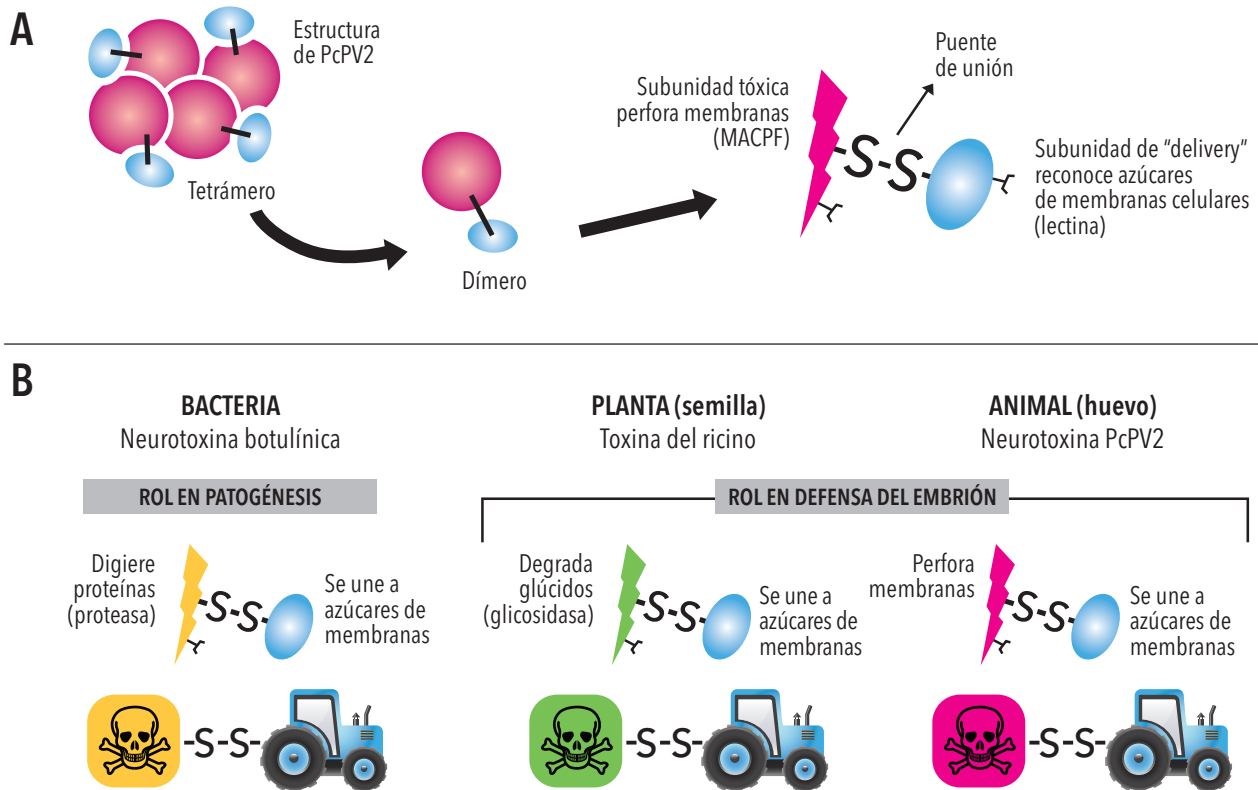


Cambios de color producidos por la combinación de astaxantina con diversas proteínas.

La toxina PcPV2 está compuesta por una combinación de proteínas única en los animales. Consiste en una proteína llamada MACPF, que forma poros en las membranas de las células, fuertemente unida a otra llamada *lectina*, que liga específicamente a determinados azúcares. Ambas proteínas son muy antiguas en la escala de la evolución, pues ya se encuentran en las bacterias. También están presentes en plantas, hongos y animales. En estos últimos cumplen sobre todo funciones en el sistema de defensa inmune. Sin embargo, aunque la evolución ha ido refinando estos compuestos por cientos de millones de años, en la carrera armamentista entre predadores y presas las armas y las defensas se perfeccionan constantemente. Es común que en la naturaleza compuestos mejorados a lo largo de millones de años tomen nuevas funciones. Así resultó que de la mezcla de dos armas del sistema inmune se generó un arma nueva, una neurotoxina letal, que potenció drásticamente la capacidad defensiva los huevos de ampularia. Gracias a la

adquisición de esta nueva estructura, antes inexistente en la naturaleza, dichos huevos están, por ahora, en el lado ganador de la carrera armamentista y casi no tienen predadores.

Solo se han observado estructuras químicas similares en toxinas de plantas (como la contenida en el ricino) y en la neurotoxina botulínica, aunque en esos casos la proteína que une azúcares se combina con toxinas diferentes a la MACPF. Comparando nuestros datos experimentales con estas toxinas, pudimos sugerir que la subunidad perforadora sería la tóxica, mientras que la lectina oficiaría de vehículo y dirigiría la toxina específicamente hacia células con determinados azúcares en sus membranas. Estas tres toxinas —la PcPV2, la del ricino y la botulínica— tienen también en común que ejercen su acción luego de ser ingeridas, y que resisten el pasaje por el sistema digestivo. Además, la toxina PcPV2 comparte con las de semillas de plantas no solo funciones de defensa sino, también, de reserva nutricia del embrión.



(A) PcPV2 es un tetrámero formado por 4 dímeros, cada uno compuesto a su vez por una subunidad que forma poros en la membrana y una subunidad que une azúcares, ambas unidas por un puente disulfuro. (B) La comparación con otras toxinas sugeriría que la subunidad perforadora sería la tóxica mientras que la lectina oficiaría de vehículo que dirigiría la toxina específicamente hacia ciertas células.

gris medular. Los huevos de la ampularia son los únicos conocidos con una neurotoxina de origen proteico.

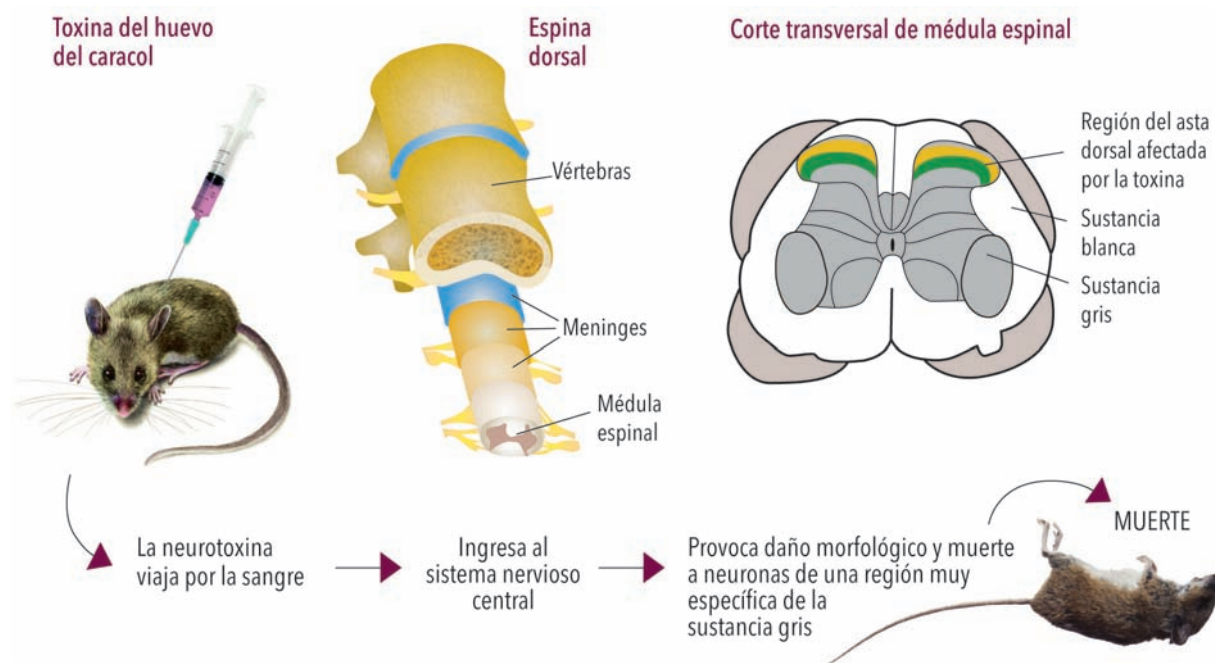
Sospechábamos que lo anterior no agotaba los mecanismos de defensa de la ampularia, y encontramos uno adicional al observar la elevada estabilidad estructural

de la ovorrubina en un amplio rango de pH (entre 4 y 12) y su capacidad de resistir la digestión gastrointestinal simulada. Esto nos sugirió que podría llegar al intestino de los potenciales depredadores de manera biológicamente activa. Por esta vía, la ovorrubina sería

¿CÓMO ACTÚA LA NEUROTOXINA DE LOS HUEVOS DEL CARACOL MANZANA?

Si bien aún hay mucho por estudiar, sabemos que si alguien ingiere la neurotoxina de los huevos del caracol manzana, esta resiste sin alteraciones apreciables el ambiente ácido y las enzimas del sistema digestivo del depredador y, una vez en el intestino, ingresa en el torrente sanguíneo y llega, por mecanismos aún no develados, al sistema nervioso central, al que provoca serio daño morfológico, alteración del metabolismo y finalmente la apoptosis (o muerte programada) de las neuronas,

probablemente por su capacidad de perforar sus membranas. Esto no ocurre en cualquier lugar del sistema nervioso sino en regiones específicas de la sustancia gris de la médula espinal, determinadas posiblemente por la especificidad del módulo lectina. Los ratones inyectados con pequeñas dosis de la toxina comienzan por mostrar signos de alteraciones neurológicas, como cambios de conducta y dificultad para moverse, hasta que finalmente la neurotoxina les ocasiona la muerte.



antinutritiva, ya que el predador no podría digerirla y así aprovechar los nutrientes del huevo. También hallamos que las proteínas del huevo poseen acción antidigestiva por la vía de inhibir la tripsina intestinal. Estudiamos este mecanismo administrando a ratas ovorrubina como suplemento dietario –e incluso suministrándoles un extracto completo de huevo–, y pudimos comprobar que la velocidad de crecimiento de esos roedores disminuyó.

Las funciones de la ovorrubina no terminan aquí. Por ejemplo, debido a la cantidad de azúcares que la componen, atrapa agua y evita la deshidratación de los huevos expuestos al sol. Además, su pigmento protegería al embrión de la radiación solar.

Las más de cincuenta otras proteínas de los huevos de ampularia todavía no fueron estudiadas, pero la comparación de sus secuencias con las de diversos organismos permite suponer que algunas pueden actuar como defensas contra insectos, hongos y bacterias, y que las hay que cumplen funciones en el sistema inmune.

Ventajas de las defensas químicas de los embriones

Se puede suponer que los mecanismos de selección natural que indica la teoría de la evolución llevaron a que, en un ambiente hostil con presencia de depredadores, aparezca este tipo de proteínas con funciones de defensa antinutritiva, antidigestiva, neurotóxica y de advertencia. El caracol manzana es el primer animal conocido que defiende sus embriones con proteínas tóxicas. El sistema, sin embargo, es frecuente en las plantas, en las que actúa en defensa de los embriones en las semillas y frutos. Con un único depredador conocido, las defensas de la ampularia resultan sin duda muy buenas y rompen la regla de que algo efectivo contra un depredador suele no serlo contra otros.

Un sistema de defensa producido íntegramente por las hembras y transferido al huevo tiene muchas ventajas. Por un lado, evita que las hembras tengan que comer



Arriba: obreras de hormiga de fuego (*Solenopsis geminata*). Miden menos de medio centímetro y son los únicos predadores confirmados de los huevos de ampularia. Abajo: hormigas de fuego depredan una puesta de huevos de ampularia. Fuente http://applesnail.net/content/photographs/fire_ants/ants_on_eggs.jpg

presas con toxinas para dotar a los embriones de defensas químicas, como hacen muchos animales. Asimismo, los restos de las defensas proteicas constituyen una reserva que alimenta al embrión y a los recién nacidos, y contribuye al éxito reproductivo de la especie.

Estos estudios, que comenzamos por la curiosidad de conocer la estructura de las proteínas de reserva de los huevos, terminaron abriendo una nueva área de estudio en ecología química, ya que no se sospechaba que esas proteínas tuvieran funciones de protección y que fueran el escudo tóxico contra predadores que la evolución proporcionó a las ampularias.

Si bien la adquisición de las particulares proteínas que describimos convirtió a los caracoles manzana en animales hoy exitosos, seguramente con el tiempo algún otro predador, además de la hormiga de fuego, evolucione y logre vencer sus defensas, en la interminable carrera armamentista de la coevolución de defensas y contradefensas. **UH**

LECTURAS SUGERIDAS

DREON MS, ITUARTE S & HERAS H, 2010, 'The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation', *PLoS One* 5, en <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015059>

DREON MS et al., 2013, 'Novel animal defenses against predation: A snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins', *PLoS One* 8, en <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063782>.

GELLER B, 2011, 'Proteínas antidigestivas y neurotóxicas defienden al caracol de agua dulce de los predadores', en <http://www.agenciacyta.org.ar/2011/07/proteinas-antidigestivas-y-neurotoxicas-defienden-al-caracol-de-agua-dulce-de-los-predadores/>

GERRITSEN VB, 2008, 'A snail's sting', *Protein spotlight*, 100: 1-2, http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/100/

HERAS H et al., 2008, 'First egg protein with a neurotoxic effect on mice', *Toxicon*, 52: 481-488.

MARSHALL M, 2010, 'Weaponised eggs turn predators' stomachs', *New Scientist*, 12, 1, en <http://www.newscientist.com/article/dn19831-zoologger-weaponised-eggs-turn-predators-stomachs.html>



Horacio Heras

Doctor en ciencias naturales,
Universidad Nacional de La Plata.
Profesor titular de química
biológica, Facultad de Ciencias
Naturales y Museo, UNLP.
Investigador principal del Conicet
en el Instituto de Investigaciones
Bioquímicas de La Plata.
h-heras@med.unlp.edu.ar